N° 60. **A. Scholl** und **H. M. Eppenberger.** — Multiple Formen der Kreatin Kinase bei Fischen. (Mit 9 Textabbildungen und einer Tafel)

Zoologisches Institut der Universität Bern, Sahlistrasse 8, und Institut de Biochimie de l'Université de Neuchâtel.

Einleitung

Die Bedeutung von Genduplikationen für die Evolution ist in jüngster Zeit von verschiedenen Autoren diskutiert worden (Ohno, 1967; Ritter, 1968; Vesell, 1968; Watts, 1968; Watts und Watts, 1968). Konkrete Beispiele sind vorwiegend auf Enzymproteine beschränkt. Nach der üblichen Version wird durch Genduplikationen die Evolution neuer Enzyme ermöglicht unter gleichzeitiger Beibehaltung kritischer enzymatischer Funktionen. Angesichts des ubiquitären Vorkommens der Mehrzahl von Enzymen und der relativen Häufigkeit von Genomduplikationen (Atkin und Ohno, 1967; Ohno, 1967) dürfte allerdings die Evolution von Enzymen mit neuen Substrat*spezifitäten* weniger bedeutsam sein als die Entstehung von Enzymen mit neuen Substrat*affinitäten.*

Die von Hunter und Markert (1957) entwickelten Methoden zum Nachweis multipler Enzyme in Gewebeextrakten regten zu einer Fülle von Publikationen über die Heterogenität der Enzyme an. Es ist heute offensichtlich, dass die Existenz der Isoenzyme, chemisch verschiedener Proteine mit gleichartiger physiologischer Wirkung, ein allgemeines Charakteristikum zellulärer Organisation ist (Markert und Whitt, 1968).

Häufig, aber nicht ausschliesslich, sind Isoenzyme genetisch bedingt, d.h. auf die Anwesenheit mehrerer Gene rückführbar (Kaplan, 1968; Markert, 1968). Häufig dürfte es sich um homologe Enzyme handeln, die durch Genduplikationen entstanden. Ihr Selektionsvorteil dürfte darin bestehen, durch mutationsbedingte Abwandelbarkeit ihrer Substrataffinitäten organspezifischen Bedürfnissen Rechnung zu tragen. Für derartige Vorstellungen sind heute experimentelle Stützen nur an wenigen Enzymsystemen bekannt (z.B. Latner und Skillen, 1968). In der vorliegenden Arbeit ist deshalb beabsichtigt, am Beispiel der Kreatin Kinase die Muster multipler Formen von Enzymen bei verschiedenen Tierspezies zu vergleichen. Dabei scheint uns zunächst *die* Frage von besonderem Interesse, ob die Zahl elektrophoretisch unterscheidbarer Kreatin Kinase-Isoenzyme korre-

Wir danken Frau E. Perriard-Mathys herzlichst für ihre Assistenz. Die Arbeit wurde unterstützt von der Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften, dem Schweizerischen Nationalfonds und einem Kredit der Muscular Dystrophy Associations of America Inc.

liert ist mit variierenden Chromosomenzahlen und DNA-Gehalten der Genome der untersuchten Fische.

Methodisches

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen je mindestens 10 ausgewachsene Tiere beiderlei Geschlechts der folgenden Arten: *Puntius schwanefeldi* (Schwanenfeld-Barbe), *Carassius auratus* (Goldfisch), *Salmo trutta f. fario* (Bachforelle), *Xiphophorus helleri* (Schwertträger). Unmittelbar nach der Tötung der Tiere wurden folgende Organe entnommen und in 3 Volumen 10% Saccharose homogenisiert: Herz, Hirn, Muskel, Magen, Darm, Gonaden, Leber, Niere. Nie wurden Organe mehrerer Tiere gepoolt. Von den Homogenaten gewannen wir durch Zentrifugation mitochondrienfreie Homogenatüberstände, die auf 1.5% Agaroseplatten (10 × 10 cm) aufgetrennt wurden. Bei jeder Spezies wurden verschiedene Puffersysteme im Trenngel verwendet (Veronal, pH 8.6, 0.02 M und 0.03 M und Citrat-NaOH-Puffer, pH 6.5, 0.01 M), ebenfalls variierten wir die Auftrennungszeit (20 Min. bis 2 Std. bei 30-40 mA). Die speziellen Versuchsbedingungen sind jeweils unter den entsprechenden Abbildungen angegeben. Bis zu diesem Präparationsschritt wurde unter Kühlraumbedingungen gearbeitet (4° C).

Zur Sichtbarmachung der Kreatin Kinasen auf den Trenngelen überschichteten wir nach beendeter Elektrophorese das Trenngel mit einem zweiten Gel, welches spezifische Reagentien zum Nachweis der Kreatin Kinase enthielt. Wir benutzten hiezu alternativ eine mehrfach ausführlich beschriebene Methode (Dawson et al., 1965, 1967; Scholl, 1969) oder eine Modifikation der Methode von Burger et al., 1964. In diesem Falle lagen die zur Sichtbarmachung der Kreatin Kinase notwendigen Reagentien im Detektorgel in folgenden Konzentrationen vor: Glycin-NaOH-Puffer, 0.2 M, pH 9.0; Mg^{++} 5 mM; ATP 3.3 mM; Phosphoenolpyruvat 2.4 mM; NADH 1.5 mM; Pyruvat-Kinase 20 mg/l; Lactat-Dehydrogenase 25 mg/l; Kreatin 4 g/l. Der Blindwert enthielt kein Kreatin.

Die mit dem Detektorgel überschichteten Trenngele wurden im Wärmeschrank bei ca. 40°C inkubiert und nach 30 und 60 Min. fotografiert. Hiezu wurden die mit dem Detektorgel überschichteten Elektrophoreseplatten auf Agfa-Lupex LN 1 Kopierpapier gelegt und von einer Camag-UV-Lampe (350 mμ) aus ca. 1 m Abstand belichtet.

Resultate

Bei der Schwanenfeld-Barbe (Fig. 1) konnten wir unter verschiedenen Auftrennungsbedingungen stets nur gesamthaft drei Isoenzymbanden beobachten. Diese Isoenzyme weisen organspezifische Verteilungsmuster auf. Nur in wenigen Fällen konnte in einem Organ die Anwesenheit aller drei Isoenzyme nachgewiesen werden. Nur drei Kreatin Kinasen scheinen auch verschiedene andere Cypriniden zu besitzen, Schleie, Rotauge, Alet und Gründling, wobei sich gegenüber der

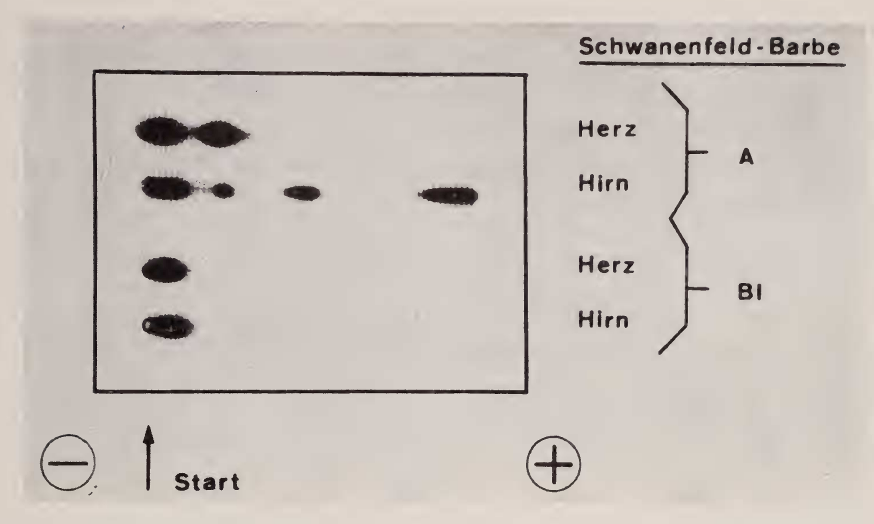


FIG. 1.

Kreatin Kinase-Isoenzymmuster der Schwanenfeld-Barbe. Fotografie einer Elektrophoreseplatte. In der mit „Start" bezeichneten Position wurden die Gewebeextrakte aufgetragen. Nach 75 Min. Elektrophorese bei 40 mA wurde eine spezifische Nachweisreaktion für Kreatin Kinase durchgeführt, obere Hälfte (A = Analyse) und die Farbreaktion ohne das spezifische Substrat, untere Hälfte (Bl = Blindwert). Die drei Positionen positiver Farbreaktion, die nur bei der Analyse auftreten, sind 3 Kreatin Kinase Isoenzyme der Barbe (Gelpuffer 0.03 M, pH 8.6; Enzymnachweis nach DAWSON et al. 1965).

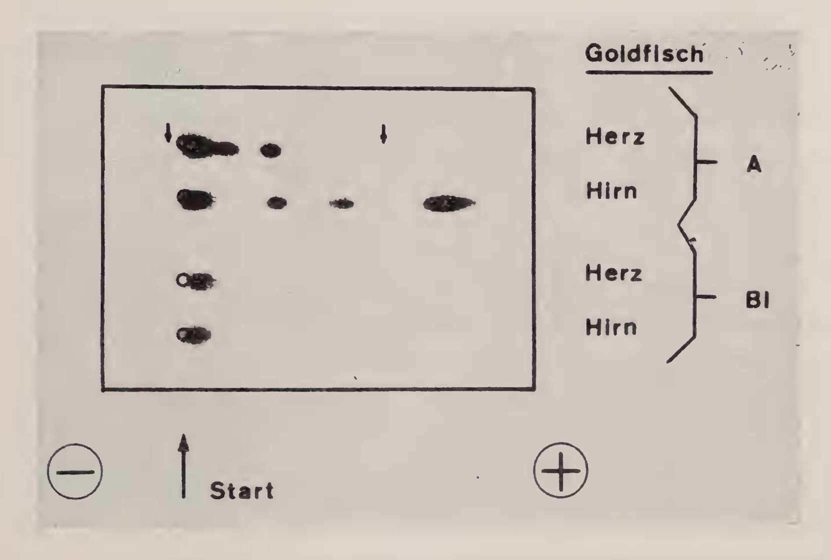


FIG. 2.

Kreatin Kinase-Isoenzymmuster des Goldfischs. Erläuterungen wie Fig. 1 (ausser: Elektrophoresedauer 60 Min.). Zusätzlich zu den vier erkennbaren Isoenzymbanden waren in Herzextrakten in den durch Pfeile gekennzeichneten Positionen zwei Isoenzyme geringer Aktivität anwesend, die sich in der Fotografie nicht wiedergeben liessen.

Schwanenfeld-Barbe Unterschiede in der relativen Wanderungsgeschwindigkeit und den organspezifischen Verteilungsmustern der Isoenzyme ergeben. Hierüber liegen allerdings erst Untersuchungen an wenigen Tieren jeder Art vor. Eine Ausnahme unter den Cypriniden bilden Karausche und Goldfisch, die durch eine erhöhte Zahl von Isoenzymbanden auffallen. Beim Goldfisch (Fig. 2) sind sechs Kreatin Kinasen nachweisbar, von denen allerdings zwei Banden geringerer Aktivität nicht bei allen Tieren beobachtet wurden (die Positionen dieser Banden sind in Fig. 2 durch Pfeile angegeben, man vergleiche damit Fig. 9). Auch hier

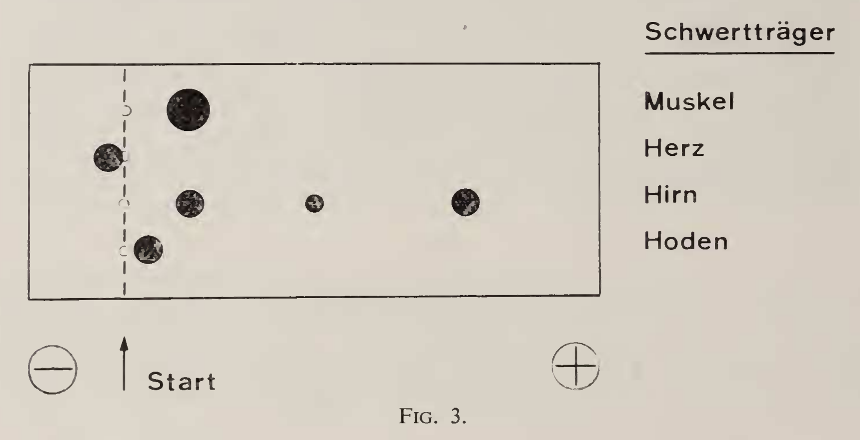


FIG. 3.

Schematische Darstellung der bei Schwertträgern gefundenen Kreatin Kinasen. Weitere Erläuterungen wie Fig. 1.

liegen wiederum organspezifische Verteilungsmuster vor; häufig ist in einem Organ jeweils nur eine Kreatin Kinase sichtbar, Herzextrakte zeigen dagegen stets mindestens drei Isoenzymbanden (s. auch Fig. 9).

Aehnlich komplexe Isoenzymmuster sind ebenfalls typisch für Schwertträger und Bachforellen. Beim Schwertträger waren maximal fünf Isoenzyme erkennbar (Fig. 3). Das in Hodenextrakten vorliegende Isoenzym konnte nur in diesem Gewebe nachgewiesen werden, dagegen findet sich in weiblichen Gonaden eine Isoenzymbande in der Position der Muskelbande.

Bei der Bachforelle konnten unter den rasch wandernden Isoenzymbanden drei Kreatin Kinasen unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit beobachtet werden, von denen eine Bande in Hirn- und Gonadengewebe auftrat, während die zweite bei den untersuchten Organen nur in Gehirnextrakten auftrat. Die dritte Bande lag nur im Gonadengewebe vor (Fig. 4). Weiterhin war unter den üblichen Auftrennungsbedingungen in Darm- und Muskelextrakten eine deutlich positive Reaktion nahe der Auftragsstelle zu beobachten, die sich nach Verlängerung der Auftrennungszeit in fünf Isoenzymbanden auftrennen liess. Eines dieser Isoenzyme liegt in Darm- und Muskelgewebe vor. Je zwei Banden traten nur in

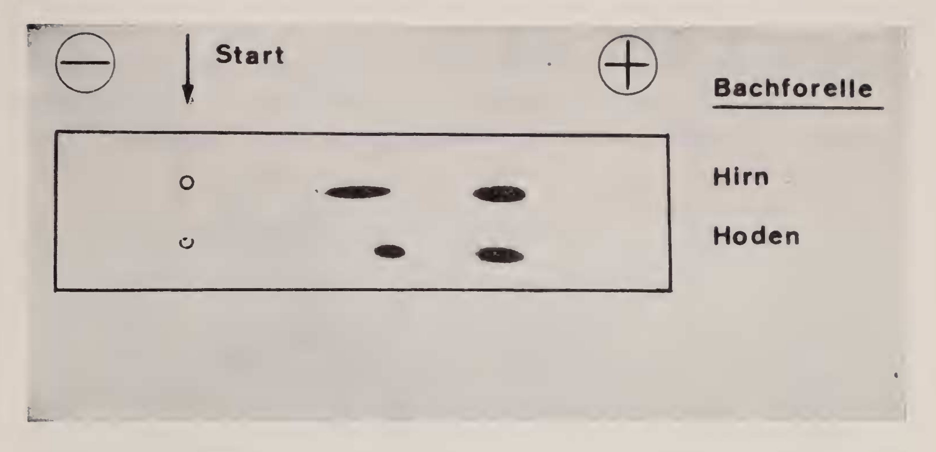


FIG. 4.

Elektrophoretische Auftrennung von Hirn- und Hodenextrakten der Bachforelle (Gelpuffer 0.03 M, pH 8.6. Auftrennung 75 Min. bei 40 mA). Positive Farbreaktion in drei verschiedenen Positionen kennzeichnet 3 Kreatin Kinase-Isoenzyme. (Die Blindwertreaktion war negativ.)

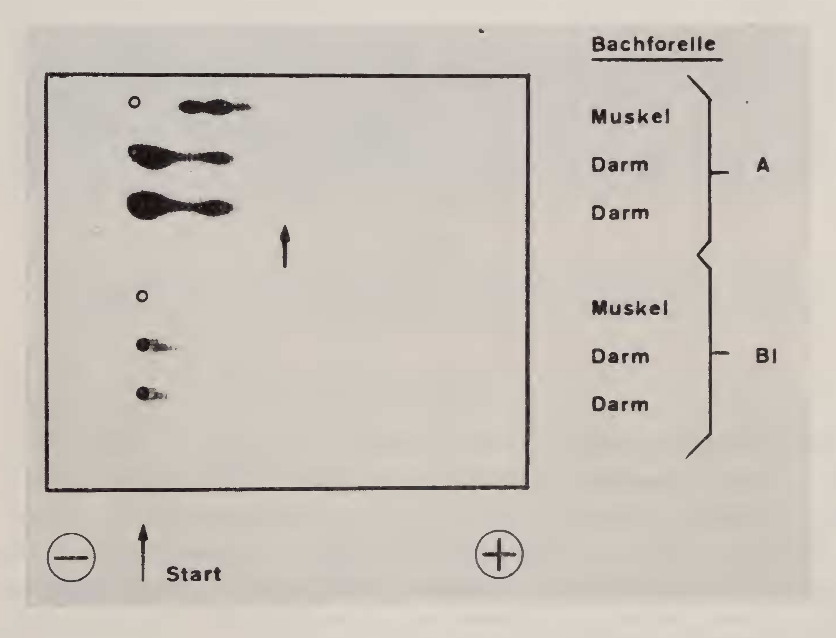


FIG. 5.

Elektrophoretische Auftrennung von Muskel- und Darmextrakten der Bachforelle (Gelpuffer 0.02 M (!), pH 8.6. Auftrennung 2 Std. (!) bei 40 mA). Positive Farbreaktionen in vier verschiedenen Positionen kennzeichnen 4 Kreatin Kinase-Isoenzyme. Ein weiteres Isoenzym geringer Aktivität ist in Darmextrakten vorhanden. Seine Position ist durch einen Pfeil markiert.

Darm- resp. Muskelextrakten auf (Fig. 5). Eines der Isoenzyme von Darmextrakten lag nur in sehr geringer Aktivität vor und liess sich auf der Fotografie der Elektrophoreseplatte nicht wiedergeben. Seine Position ist in Fig. 5 durch einen Pfeil markiert. Gesamthaft wurden bei der Bachforelle in den verschiedenen Organen acht Isoenzymbanden mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität beobachtet.

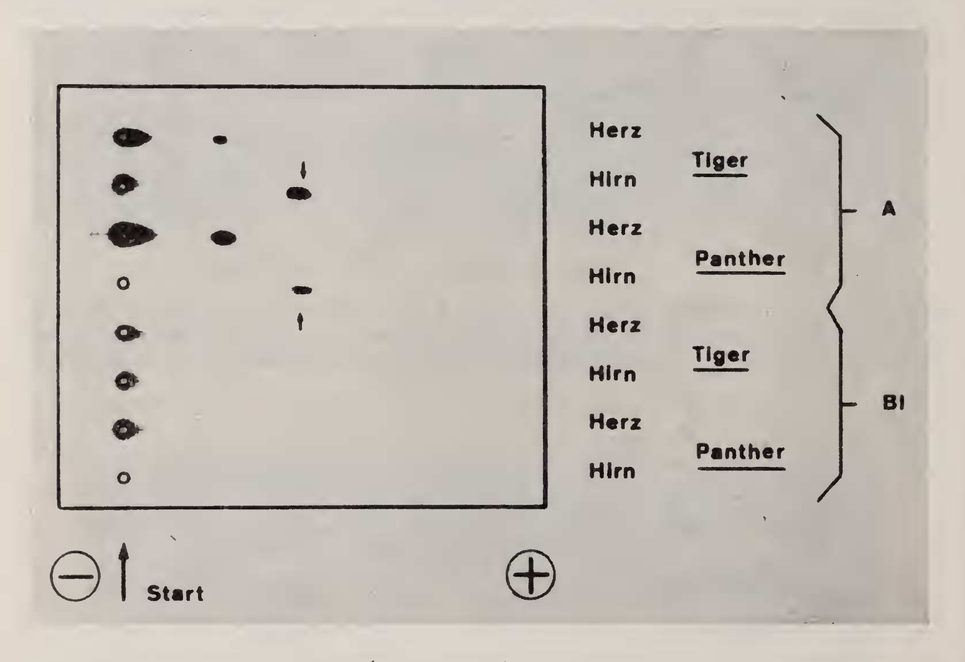


Fig. 6.

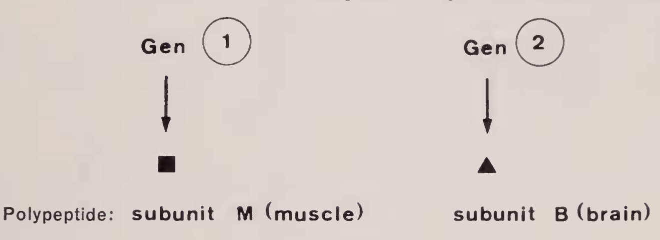
Kreatin Kinase-Isoenzymmuster von Tiger und Panther. Weitere Erläuterungen wie Fig. 1. Versuchsbedingungen: Gelpuffer 0.02 M, pH 8.6. 50 Min. Auftrennung bei 30 mA.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat vergleichenden Charakter, deshalb seien den hier an Fischen erhobenen Befunden die Verhältnisse bei Säugern und Vögeln kurz vorangestellt. Multiple Formen der Kreatin Kinase wurden erstmals von Burger et al. (1963) und Eppenberger et al. (1964) beobachtet. Die Autoren wiesen bei Säugern drei Isoenzyme nach. Drei Kreatin Kinasen scheinen für Säuger typisch zu sein (Fig. 6), ausser den hier dargestellten Spezies haben wir eine Reihe anderer Säuger untersuchen können (Scholl und Eppenberger, unpubl.) und im Einklang mit anderen Autoren (Richterich et al., 1968) nie mehr als drei Isoenzyme beobachtet. Auf Grund von Untersuchungen an gereinigten Kreatin Kinasen (Dawson et al., 1965; Eppenberger et al., 1967) kann die

molekulare Basis dieser Enzymheterogenität heute wie folgt gedeutet werden (Fig. 7): Es existieren zwei Gene mit der Information zur Synthese zweier verschiedener Polypeptide, subunit M und subunit B. Das enzymatisch aktive Protein ist aufgebaut aus zwei subunits, die gleichen Typs oder verschiedenartig sein können. Der molekulare Aufbau der drei Isoenzyme ist aus Fig. 7 ersichtlich.

Vögel weisen komplexere Isoenzymmuster auf (EPPENBERGER et al., 1968; DAWSON et al., 1968) (Fig. 8). Umfangreiche systematische Untersuchungen



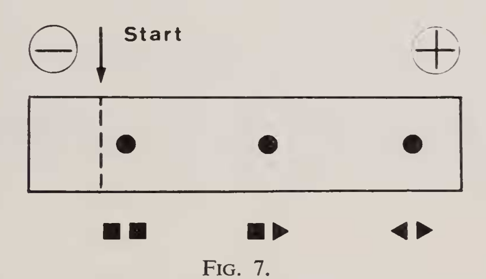


FIG. 7.

Schema zur Erläuterung der genetischen Grundlagen der Enzymheterogenität bei Säugern (s. Text).

ergaben bei allen Vögeln gesamthaft fünf Isoenzymbanden, von denen ein Isoenzym regelmässig nur in bestimmten Entwicklungsstadien der Skelettmuskulatur in Erscheinung tritt (SCHOLL und EPPENBERGER, 1969). Dieses Isoenzymmuster scheint ebenfalls nur auf der Anwesenheit zweier Kreatin Kinase-Gene zu beruhen, Die globale Aminosäurezusammensetzung isolierter Hirnenzyme vom Sperling und von der Haus-Taube hat weder beim Sperling noch bei der Taube signifikante Unterschiede ergeben. Sperlings- und Taubenenzym sind dagegen stark verschieden (DAWSON et al., 1968; EPPENBERGER und SCHOLL, in Vorbereitung). Auf Grund dieser und anderer Ergebnisse wurde diskutiert (KAPLAN, 1968; DAWSON et al., 1968; SCHOLL und EPPENBERGER, 1969), dass bei der Bildung der Tertiär- oder Quaternärstruktur des Proteines alternative thermodynamisch mögliche Konfigurationen bestehen können, die sich in unterschiedlichen Oberflächenladungen

des Proteins und bedingt dadurch unterschiedlichem Verhalten bei der Elektrophorese äussern.

Diese Verhältnisse zeigen im Hinblick auf die vorliegende Untersuchung, dass zwischen der Zahl elektrophoretisch unterscheidbarer Isoenzyme und der dieser Enzymheterogenität zugrunde liegenden genetischen Loci keine einfache

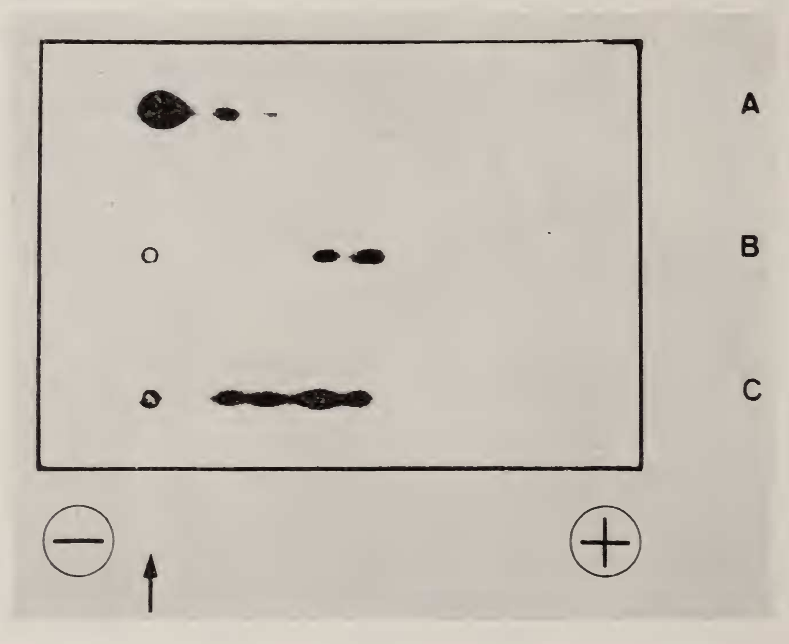


Fig. 8.

Kreatin Kinase-Isoenzymmuster der Hausente (A = Beinmuskel, adulte Ente; B = Hirn, adulte Ente; C = Beinmuskel, Entenembryo 13 Tage). Gesamthaft sind fünf Isoenzymbanden unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit sichtbar. Während der Differenzierung der Skelettmuskulatur ändert sich das Isoenzymmuster dieses Gewebes.

Korrelation zu erwarten ist. Dennoch sei hier versucht, die Beobachtungen an Fischen als Ausdruck genetischer Variation zu interpretieren. Dies scheint unter den erwähnten Vorbehalten möglich. Einerseits liegen inzwischen ähnliche Untersuchungen über die Heterogenität anderer Enzyme bei Fischen vor (Bailey et al., 1969; Bender und Ohno, 1968; Klose et al., 1969; Massaro und Markert, 1968), weiterhin sind bei den von uns untersuchten Fischspezies Chromosomenzahlen und relativer DNA-Gehalt der Genome bekannt (Ohno und Atkin, 1966; Ohno et al., 1967), vgl. Tab. 1.

Das Isoenzymmuster der Barbe ähnelt den Verhältnissen bei Säugern. Man kann deshalb vermuten, dass es sich, wie bei Säugern, aus zwei genetisch verschiedenen subunits aufbaut. Allerdings fällt auf, dass die mittlere Bande nicht

intermediär zwischen den Extremformen lokalisiert ist. Hierin liegt ein Unterschied gegenüber den Säugerenzymen, bei denen unabhängig von den absoluten und relativen Wanderungsgeschwindigkeiten der Isoenzyme unter unseren Versuchsbedingungen die Position der Hybridbande stets in der Mitte zwischen beiden Extremformen anzutreffen war.

TABELLE I.

Chromosomenzahlen und relativer DNA-Gehalt der untersuchten Fischspezies
(Nach: OHNO et al. 1967 und OHNO und ATKIN 1966)

Art	Chromosomenzahl (2 n)	DNA-Gehalt [1]
Puntius schwanefeldi [2] (*Barbus = Puntius tetrazona*)	50	0.20
Carassius auratus	104±	0.53
Salmo trutta f.fario [2] (*Salmo irideus*)	60±	0.84
Xiphophorus helleri	48	0.24

[1] relativer DNA-Gehalt, bezogen auf den DNA-Gehalt menschlicher Leukozyten (♀).
[2] für Puntius schwanefeldi und Salmo trutta f.fario sind Angaben über Chromosomenzahlen und DNA-Gehalt nicht bekannt.

Das Genom von Goldfischen und Karpfen weist die doppelte Chromosomenzahl und auch einen doppelt so hohen DNA-Gehalt auf wie das Genom zweier *Puntius*-Arten (OHNO et al., 1967). Dieser Unterschied wird als Folge einer Genomduplikation gedeutet. Von *Puntius tetrazona* und *Puntius fasciatus*, den von OHNO und Mitarbeitern untersuchten Spezies, standen uns nur Jungtiere zur Verfügung, die sich infolge ihrer geringen Grösse für die Untersuchungen als ungeeignet erwiesen. Deshalb vergleichen wir hier *Puntius schwanefeldi* und *Carassius auratus* in der wohl berechtigten Annahme, das Genom von *Puntius schwanefeldi* gleiche bezüglich Chromosomenzahl und DNA-Gehalt anderen *Puntius*-Arten.

Es ist auffallend, dass Goldfisch und Karausche mehr Kreatin Kinase-Isoenzyme besitzen als andere Cypriniden. Dies trifft auch für multiple Formen der Lactat-Dehydrogenase und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (KLOSE et al., 1969) zu und kann in Einklang mit den karyologischen Daten als Folge einer Genomduplikation und anschliessender Divergenz der duplizierten Gene gedeutet werden. In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass die Divergenz sich nicht nur in veränderter elektrophoretischer Mobilität äussert, sondern ebenfalls in organspezifischen Verteilungsmustern. Die zusätzlichen Banden der

Kreatin Kinase finden sich vorwiegend in Herzextrakten (Fig. 2, Fig. 9). Die zusätzliche Information der duplizierten Gene wird organspezifisch unterschiedlich genutzt. Dieser Vorstellung liegt die übliche Interpretation organspezifischer Isoenzymmuster als Ausdruck differentieller Genaktivitäten zugrunde.

Multiple Formen eines Enzyms können ausser auf verschiedenen Loci auch auf Allelen eines Gens beruhen (Kaplan, 1968; Markert, 1968). Diese Möglichkeit war besonders für die Deutung der komplexeren Isoenzymmuster von Schwert-

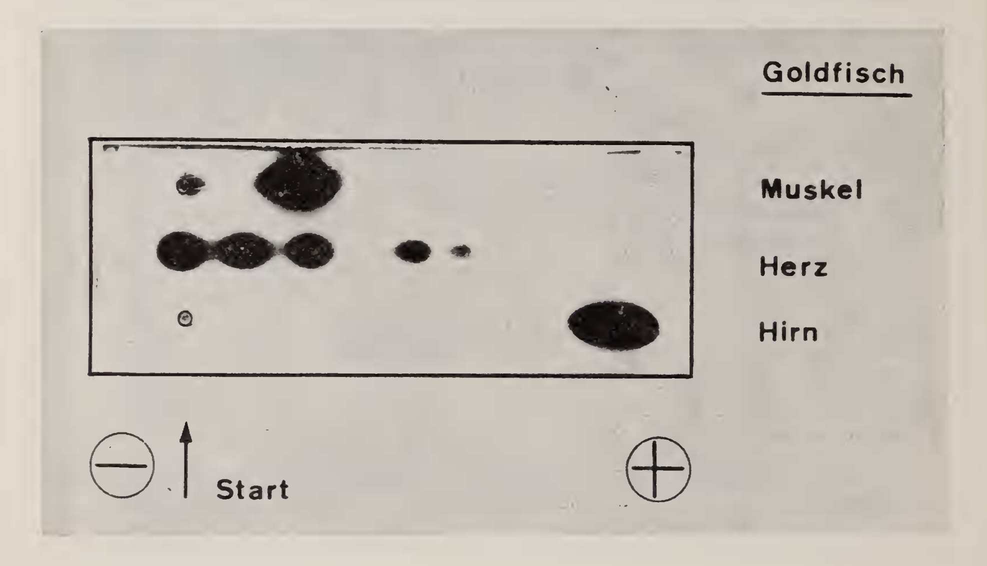


Fig. 9.

Organverteilungsmuster der Kreatin Kinasen beim Goldfisch. Es ist zu beachten, dass nur das Herzgewebe eine hohe Isoenzymzahl aufweist. Elektrophorese 60 Min. bei 40 mA. Gelpuffer 0.02 M, pH 8.6. Enzymnachweis nach Burger et al., 1964.

träger und Bachforelle zu prüfen, Zuchtformen, bei denen selbst die Einkreuzung anderer Arten möglich ist. In diesem Fall wären polymorphe Bandenmuster zu erwarten (Scopes und Gosselin-Rey, 1968), was bei beiden Spezies nicht zutraf. Ausser Bachforellen wurden verschiedene andere Salmoniden untersucht. Das Isoenzymmuster von Regenbogenforellen ist praktisch identisch mit dem der Bachforelle. Ebenso sind die Muster von Felchen und Aeschen sehr ähnlich.

Diese Heterogenität könnte bedingt sein durch vier Kreatin Kinase-Loci. Durch die Bildung homo- und heterodimerer Enzymproteine würde man dann zehn Isoenzymvarianten unterschiedlichen molekularen Aufbaues erwarten. Dass bei der Bachforelle nur acht Enzymbanden beobachtet wurden, ist schon allein deshalb kein Widerspruch, weil Varianten verschiedenen molekularen Aufbaues gleiche elektrophoretische Mobilität haben können (Goldberg, 1966).

Das Forellengenom wird auf Grund karyologischer Vergleiche mit Clupeidengenomen als tetraploid angesehen (Klose et al., 1968). Wir möchten hiezu bemerken, dass neuen Systemvorschlägen zufolge (Greenwood et al., 1966) Clupeiden und Salmoniden entferntere phylogenetische Verwandtschaft zeigen, als in der üblichen Systematik der Fische (Berg, 1958) zum Ausdruck kommt. Greenwood und Mitarbeiter gliedern die rezenten Teleosteer in drei Abteilungen, die unabhängig von einander aus pholidophoroiden Holosteern evoluierten. Clupeiden und Salmoniden sind in dieser Systematik unter zwei verschiedenen Abteilungen eingereiht. Bei nahe verwandten Spezies können sich schon grosse karyologische Unterschiede ergeben (Muramoto et al., 1968). Trotzdem ist es auffallend, wie sehr bei Salmoniden und Clupeiden biochemische Befunde (Klose et al., 1968) die karyologischen Daten ergänzen. Wir haben ebenfalls bei Clupeiden sehr einfache Kreatin Kinase-Isoenzymmuster (Säugertyp) festgestellt. Diese Ergebnisse sind hier nicht ausführlich mitgeteilt, weil sie sich bisher nur auf Tiermaterial stützen, das längere Zeit tiefgefroren aufbewahrt wurde. Unter diesen Bedingungen können sich nach unseren Erfahrungen Isoenzymmuster insofern ändern, als durch an sich geringfügigen Verlust von Enzymaktivität Isoenzymbanden geringerer Intensität verschwinden können.

Zusammenfassung

Durch elektrophoretische Auftrennung von Organextrakten und spezifische Anfärbung von Kreatin Kinasen werden bei verschiedenen Fischspezies sehr unterschiedliche Kreatin Kinase-Isoenzymmuster nachgewiesen. Im allgemeinen weisen die untersuchten Fischarten mehr Isoenzymbanden auf als Säuger und Vögel, was den Schluss nahelegt, dass bei diesen Fischarten mehr Kreatin Kinase-Strukturgene vorhanden sind. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit aus der Literatur bekannten Daten über die Varianz von Chromosomenzahlen und DNA-Gehalten der Fischgenome. Es wird angedeutet, dass das methodische Vorgehen geeignet ist zum Studium molekularer Aspekte der Evolution.

Summary

Electrophoretic separation of tissue-extracts from several fish-species and specific staining for creatine kinase activity reveals a great heterogeneity of creatine kinases in fish. In comparison to mammals and birds more isoenzymes can be distinguished in some species. This suggests that in these fishes more genes for creatine kinase are present than in birds and mammals. These results are in good agreement with comparative data on chromosome complements and DNA-values of fishes. It is pointed out that the methods applied are useful for studies of molecular aspects of evolution.

LITERATURVERZEICHNIS

ATKIN, N. B. and S. OHNO. 1967. *DNA values of four primitive chordates*. Chromosoma (Berl.) 23: 10-13.

BAILEY, G. S., G. T. COCKS and A. C. WILSON, 1969. *Gene duplication in fishes: malate dehydrogenases of salmon and trout*. Biochem. biophys. Res. Communs. 34: 605-612.

BENDER, K. and S. OHNO. 1968. *Duplication of the autosomally inherited 6-phosphogluconate dehydrogenase gene locus in tetraploid species of cyprinid fish*. Biochem. Genet. 2: 101-107.

BERG, L. S. 1958. *System der rezenten und fossilen Fischartigen und Fische*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

BURGER, A., M. EPPENBERGER, U. WIESMANN und R. RICHTERICH. 1963. *Isoenzyme der Kreatin Kinase*. Helv. Physiol. Acta 21: C6-C10.

— R. RICHTERICH und H. AEBI. 1964. *Die Heterogenität der Kreatin Kinase*. Biochem. Z. 339: 305-314.

DAWSON, D. M., H. M. EPPENBERGER, and M. E. EPPENBERGER. 1968. *Multiple molecular forms of the creatine kinases*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151: 616-626.

— H. M. EPPENBERGER, and N. O. KAPLAN. 1965. *Creatine kinase: Evidence for a dimeric structure*. Biochem. biophys. Res. Communs. 21: 346-353.

— H. M. EPPENBERGER, and N. O. KAPLAN. 1967. *The comparative enzymology of creatine kinases. II. Physical and chemical properties*. J. biol. Chem. 242: 210-217.

EPPENBERGER, H. M., D. M. DAWSON, and N. O. KAPLAN. 1967. *The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues*. J. biol. Chem. 242: 204-209.

— M. EPPENBERGER, R. RICHTERICH, and H. AEBI. 1964. *The ontogeny of creatine kinase isozymes*. Dev. Biol. 10: 1-16.

— M. E., H. M. EPPENBERGER, and N. O. KAPLAN. 1967. *Evolution of creatine kinase*. Nature 214: 239-241.

GOLDBERG, E. 1966. *Lactate dehydrogenase of trout: Hybridization in vivo and in vitro*. Science 151: 1091-1093.

GREENWOOD, P. H., D. E. ROSEN, S. H. WEITZMAN, and G. S. MYERS. 1966. *Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms*. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 131: 339-455.

HUNTER, R. L. and C. L. MARKERT. 1957. *Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels*. Science 125: 1294-1295.

KAPLAN, N. O. 1968. *Nature of multiple molecular forms of enzymes*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151: 382-399.

KLOSE, J., U. WOLF, H. HITZEROTH, H. RITTER, N. B. ATKIN, and S. OHNO. 1968. *Duplication of the LDH gene loci by polyploidization in the fish order clupeiformes*. Humangenetik 5: 190-196.

— U. WOLF, H. HITZEROTH, H. RITTER, and S. OHNO. 1969. *Polyploidization in the fish family cyprinidae, order cypriniformes. II. Duplication of the gene loci coding for lactate dehydrogenase (E. C.: 1.1.1.27) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (E. C.: 1.1.1.44) in various species of cyprinidae*. Humangenetik 7: 245-250.

LATNER, A. L. and A. W. SKILLEN. 1968. *Isoenzymes in biology and medecine*. Academic Press, New York and London.

MARKERT, C. L. 1968. *The molecular basis for isozymes*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151: 14-40.

— and G. S. WHITT. 1968. *Molecular varieties of isozymes*. Experientia 24: 977-991.

MASSARO, E. J. and C. L. MARKERT. 1968. *Isoenzyme patterns of salmonid fishes: evidence for multiple cistrons for lactate dehydrogenase polypeptides*. J. exp. Zool. 168: 223-238.

MURAMOTO, J., S. OHNO and N. B. ATKIN. 1968. *On the diploid state of the fish order ostariophysi*. Chromosoma (Berl.) 24: 59-66.

OHNO, S. 1967. *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Vol. I. Monographs on Endocrinology. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

— and N. B. ATKIN. 1966. *Comparative DNA-values and chromosome complements of eight species of fishes*. Chromosoma (Berl.) 18: 455-466.

— J. MURAMOTO, L. CHRISTIAN, and N. B. ATKIN. 1967. *Diploid-tetraploid relationship among old-world members of the fish family cyprinidae*. Chromosoma (Berl.) 23: 1-9.

RICHTERICH, R., U. WIESMANN and B. CANTZ. 1968. *Comparative studies on creatine kinase and its isoenzymes*. In: Homologous enzymes and biochemical evolution, N. van Thoai and J. Roche, editors. Gordon and Breach, New York.

RITTER, H. 1968. *Zur transspezifischen Evolution von Proteinen*. Humangenetik 5: 173-189.

SCHOLL, A. 1969. *Nachweis hoher Aktivitäten von Kreatin Kinase bei dem Chaetognathen Sagitta setosa*. Experientia 25: 216-217.

— and H. M. EPPENBERGER. 1969. *New creatine kinase isoenzymes in birds. Distribution among avian orders, tissue-specific patterns and their appearance in ontogeny*. Experientia 25: 794-796.

SCOPES, R. K. and C. GOSSELIN-REY. 1968. *Polymorphism in carp muscle creatine kinase*. J. Fish. Res. Bd. Canada 25: 2715-2716.

VESELL, E. S. 1968. *Multiple molecular forms of enzymes*. Introduction. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151: 5-13.

WATTS, D. C. 1968. *Variation in Enzyme structure and function: The guidelines of evolution*. Adv. comp. Physiol. Biochem. 3: 1-91.

— R. L. and D. C. WATTS. 1968. *Gene duplication and the evolution of enzymes*. Nature 217: 1125-1130.
